

LA BIOPHYSIQUE

I : Définition de la biophysique et rappel sur la structure des protéines

Discipline qui analyse les phénomènes biologiques (biomécanique, imagerie médicale, fonction des organes, ...) et la structure des macromolécules biologiques à l'aide de théories et de techniques de la physique (voire de la chimie).

Il existe quatre niveaux de structure des protéines :

- la structure primaire : c'est la séquence en acides aminés ou enchaînement polypeptidique
- les structures secondaires : c'est l'ensemble des structures locales spécifiques qu'adoptent certaines parties d'une protéine. C'est une étape du repliement des protéines
- la structure tertiaire ou structure tridimensionnelle : parmi les innombrables structures que peut adopter une protéine, c'est la seule structure qui lui confère sa fonction biologique.
- la structure quaternaire : certaines protéines sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques (appelées sous-unités) identiques ou non. La structure quaternaire est l'arrangement spatial de ces différentes sous-unités.

Le nombre de conformations connues de protéines significativement différentes (moins de 25% d'acides aminés identiques entre deux séquences) est de 1500. La distribution observée des repliements est très hétérogène (certains sont très peuplés, d'autres beaucoup moins). On évalue à environ 10.000 le nombre total de structures protéiques originales qui suffirait à modéliser la quasi-totalité des protéines connues.

II : La spectroscopie

A : la spectroscopie ultraviolet visible - la spectroscopie infrarouge

Les méthodes spectroscopiques sont utilisées pour analyser les macromolécules parce que ce sont des techniques d'analyse non destructrices.

B : La fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (ou lumière d'excitation) et de la restituer rapidement (< 1 nsec) sous forme de lumière fluorescente (ou lumière d'émission).

Cependant :

une partie de l'énergie de la lumière d'excitation est absorbée par d'autres molécules du milieu et une autre partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur.

En conséquences, l'énergie de la lumière d'émission est plus faible que celle de la lumière d'excitation : la lumière d'émission (la fluorescence) a donc une longueur d'onde plus élevée.

Remarque : si l'émission de la lumière cesse dès l'arrêt de l'excitation c'est la fluorescence. Si la matière continue d'émettre de la lumière après avoir été éclairée, c'est la phosphorescence.

De nombreuses techniques se sont développées :

Le marquage simple se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer l'immunomarquage direct ou indirect qui utilise un anticorps marqué par un élément radioactif.

- la technique du FISH ("Fluorescence In Situ Hybridization") sert à marquer des séquences nucléotidiques
- la technique du FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer") utilise deux fluorochromes, un donneur qui va transmettre son énergie à un autre fluorochrome accepteur. Elle permet d'étudier des interactions entre deux molécules
- la GFP ("Green Fluorescent Protein") consiste à intégrer dans le génome de la cellule à observer un gène de protéine fluorescente, la protéine synthétisée est alors fluorescente

c : Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire s'appuie sur la capacité des molécules qui ont une activité optique d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. L'activité optique est la propriété que possède une structure chirale d'interagir avec un rayonnement électromagnétique. Elle est à l'origine de :

- du dichroïsme circulaire
- du pouvoir rotatoire
- de la dispersion optique
- de la polarisation circulaire d'émission

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet d'analyser le contenu en structures secondaires des protéines ou des acides nucléiques. Pour déterminer la proportion de chaque type de structure secondaire, il faut effectuer une déconvolution en composantes élémentaires du spectre de dichroïsme avec des logiciels appropriés.

Cette technique non destructive qui permet d'étudier les changements de conformation des protéines dans différents environnements (pH, agents dénaturants, température).

IV : La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Son caractère non destructif a conduit à divers développements de cette méthode qui est employée :

- en chimie organique pour des analyses structurales
- en génomique structurale pour obtenir une image tridimensionnelle des molécules du vivant
- en médecine pour étudier le corps humain (image à résonance magnétique nucléaire - IRM)

Va : La cristallographie ou diffraction des rayons X

La cristallographie est la science qui se consacre à l'étude des substances cristallines à l'échelle atomique. L'état cristallin est défini par un caractère périodique et ordonné à l'échelle atomique ou moléculaire. Ce caractère périodique est appelé la maille élémentaire.

La cristallogénèse est la formation d'un cristal, soit en milieu naturel, soit de façon expérimentale. C'est le passage d'un état désordonné liquide à un état ordonné solide, contrôlé par la température, la pression, le temps d'évaporation et des lois cinétiques complexes :

- 1ère phase : la germination correspond à l'apparition d'une phase cristalline stable à partir d'un liquide surfondu ou d'une solution sursaturée

- 2ème phase : la croissance est le processus qui va suivre la germination et permettre l'augmentation de taille des germes pour conduire aux cristaux

La plupart des substances minérales et des petites molécules organiques cristallisent facilement et les cristaux obtenus sont en général sans défaut.

En revanche les macromolécules biologiques, comme les protéines, sont souvent très difficiles à cristalliser. C'est par cristallographie que J. Watson, F. Crick, M. Wilkins et R. Franklin ont pu déterminer la structure hélicoïdale de l'ADN en 1953 (Prix Nobel en 1962).

Vb : La banque de données "Protein data Bank" (PDB)

Elle contient l'ensemble des données structurales des protéines (plus de 27.855 structures !) obtenues par cristallographie ou par RMN. Chaque jour, six nouvelles structures tridimensionnelles y sont déposées.

Le nombre de conformations connues de protéines significativement différentes (moins de 25% d'acides aminés identiques entre deux séquences) est de 1500. La distribution observée des repliements est très hétérogène (certains sont très peuplés, d'autres beaucoup moins).

On évalue à environ 10.000 le nombre total de structures protéiques originales qui suffirait à modéliser la quasi-totalité des protéines connues. Les fichiers PDB sont de divers formats.

VI : la spectrométrie de masse

Les protéines sont de grosses molécules biologiques. La spectrométrie de masse permet de les fractionner (actuellement jusqu'à $2 \cdot 10^5$ Dalton) en les ionisant, puis de déduire la masse de ces molécules selon leurs trajectoires.

Les fragments sont accélérés par un champ magnétique et/ou électrique et ils sont triés en fonction de leur rapport : masse/charge (M/z).

VII : La résonance paramagnétique électronique (RPE)

Un radical libre est un atome ou une molécule qui possède un ou plusieurs électron célibataire. Un électron célibataire engendre une grande instabilité de la molécule. Les espèces radicalaires sont produites naturellement par phénomène d'oxydation et peuvent s'attaquer aux composés vitaux des cellules.

La résonance paramagnétique électronique est une méthode directe d'étude des phénomènes radicalaires. Elle permet donc de mettre en évidence des composés possédant au moins un électron célibataire.

VIII : La mécanique et la modélisation moléculaires

Ce type d'approche est complémentaire des techniques physiques qui précèdent. Ces objectifs sont entre autres :

- la "visualisation" informatique des molécules à partir de données structurales (cristallographiques, RMN, spectroscopiques , ...)
- l'obtention d'informations sur la dynamique et l'énergie des molécules
- calculer le champ de force pour déterminer les propriétés des molécules
- corréler ces propriétés à une structure moléculaire
- valider la structure moléculaire

Différents outils informatiques sont utilisés pour :

- visualiser la structure des molécules en 3 dimensions
- les "manipuler" (rotation, translation, changement de conformation)
- calculer les paramètres géométriques (distance inter atomique, angle, ...)

